

## Zum Einfluß der totalen Hormonkonzentration auf die Ermittlung von Bindungskenngrößen bei der Hormon/Receptor-Wechselwirkung zwischen Erythrocyten und Insulin

Von A. Dwenger, W. Holle, P. Tost und I. Trautschold

Abteilung für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 29. November 1982/21. Juni 1983)

**Zusammenfassung:** Die Wechselwirkung von Erythrocyten mit [<sup>125</sup>I]Insulin/Insulin wird bis zu einer totalen Insulinkonzentration von 409 µmol/l untersucht. Die Bindungskenngrößen Receptorkonzentration  $R_0$  und Receptoraffinität  $K_a$  werden unter Annahme eines einklassigen Receptormodells sowohl mit Hilfe eines nichtlinearen Regressionsverfahrens durch Iteration von  $R_0$ ,  $K_a$  und  $U$  (unspezifische Bindung) ermittelt als auch mit Hilfe eines linearen Regressionsverfahrens im initialen Teil des *Scatchard* plots. Bei nichtlinearer Anpassung an ein zweiklassiges Receptormodell liefern lediglich die Daten für den hochaffinen Receptor zuverlässige Werte. Die Ermittlung der Kenngrößen mit Hilfe des negativen Kooperativitätsmodells ist durch den nicht definierbaren Schritt der graphischen  $R_0$ -Ermittlung mit Unsicherheiten behaftet. Aus den Befunden der Untersuchungen und aus Überlegungen zur Signalmodulation durch die Besetzungsdichte des Receptors werden Empfehlungen zur Kenngrößenextraktion gegeben, die zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von Untersuchungen zur Wechselwirkung von Erythrocyten mit Insulin beitragen sollen.

*The influence of total hormone concentrations on the determination of hormone/receptor binding data from the interaction of erythrocytes and insulin*

**Summary:** The interaction of erythrocytes and [<sup>125</sup>I]insulin/insulin were studied up to a total insulin concentration of 409 µmol/l. Assuming a single class receptor model the evaluation of receptor affinity  $K_a$  and concentration  $R_0$  may be performed either by non-linear regression analyses with iteration procedures of  $R_0$ ,  $K_a$  and  $U$  (nonspecific binding), or by a linear regression analysis of the initial part of the *Scatchard* plot. Non-linear fitting of data to a two class receptor model gives results that are reliable only for the high affinity receptor site. The non-definable step of  $R_0$  determination leads to uncertainties in results determined by the negative cooperativity model. From the results of this investigation and from considerations of signal modulation by receptor occupancy, some recommendations have been formulated for the evaluation of binding parameters; these should contribute to an improvement in the comparability of studies on the interactions of erythrocytes and insulin.

### Einführung

Durch nichtkovalente reversible Bindung eines Peptidhormons an komplementäre Plasmamembranstrukturen wird eine Signalkette initiiert, die eine zelluläre biologische Antwort erzeugt. Das erste Ereignis dieser Sequenz, die Bindung des Hormons an seinen Receptor (Gl. 1) gehorcht dem Massenwir-

kungsgesetz (Gl. 2) und kann quantitativ analysiert werden.



$$\frac{[HR]}{[H][R]} = K_a \quad K_a = \frac{1}{K_d} \quad \text{Gl. 2}$$

Wenn hierbei die Voraussetzungen:

- identische Reaktion markierten und unmarkierten Hormons
- bimolekulare reversible Reaktion eines monomeren Hormonmoleküls mit einem Receptormolekül
- Unabhängigkeit der Receptormoleküle bzw. Receptorbindungsstellen
- Ermittlung der Daten unter Gleichgewichtsbedingungen

erfüllt sind, kann eine Analyse von Bindungsexperimenten (Bindung radioaktiv markierten Hormons in Gegenwart unmarkierten Hormons) mit Hilfe eines Verfahrens nach *Scatchard* (1) erfolgen, das die bimolekulare reversible Reaktion eines kleinen Liganden mit einem Makromolekül quantitativ beschreibt.

Aus der Umformung von Gleichung 2 und unter Verwendung von Gleichung 3 ergibt sich Gleichung 4, die nach Erfüllung der Voraussetzungen (a)–(d) einen linearen Zusammenhang zwischen  $[HR]/[H]$  und  $[HR]$  zeigt, aus dem sich

$$[R_0] = [R] + [HR] \quad \text{Gl. 3}$$

$$\frac{[HR]}{[H]} = -K_a[HR] + K_a[R_0] \quad \text{Gl. 4}$$

für  $K_a[R_0] \rightarrow 0$  die Affinitätskonstante  $K_a$  und für  $[HR]/[H] \rightarrow 0$  die maximal gebundene Hormonkonzentration  $[R_0]$  ermitteln lassen. Wenn die Voraussetzung (b) zutrifft, läßt sich bei Bindungsexperimenten mit intakten isolierten Zellen die Receptorenzahl pro Zelle nach Gleichung 5 berechnen.

Receptoren/Zelle  $R_0 =$

$$\frac{\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ geb. Hormon} \cdot 6,023 \cdot 10^{23}}{\text{Zellzahl} \cdot \text{l}^{-1}} \quad \text{Gl. 5}$$

Wendet man die Datentransformation nach *Scatchard* auf Bindungsexperimente mit Insulin und Insulinreceptoren oder Insulinantikörpern an (2), so werden in aller Regel nichtlineare, konkav-gekrümmte Zusammenhänge zwischen  $[HR]/[H]$  und  $[HR]$  beobachtet. Zur Erklärung hierfür werden verschiedene Modelle diskutiert, das Modell mit zwei unabhängigen spezifischen Receptorklassen (3) (high affinity/low capacity and low affinity/high capacity sites) und bisher vorzugsweise das negative Kooperativitätsmodell (4). An der Gültigkeit des letzteren wird zunehmend Kritik geübt (5), das Modell mit zwei unabhängigen Receptorklassen oder einer Receptorklasse in zwei definierten unterschied-

lich affinen Zuständen (6) ist lediglich das einfachste willkürliche Modell mit mehr als einer Receptorklasse, wobei eine Erhöhung der Zahl an Receptorklassen nicht zu einer Steigerung der biologischen Regulationseffizienz führen muß und darüberhinaus auch dem Prinzip der größtmöglichen Unkompliziertheit lebender geregelter Systeme zu widersprechen scheint. Zur Zeit gibt es keine entscheidenden Befunde und Argumente, die eines der vorgeschlagenen Modelle favorisieren.

Es ist offensichtlich, daß die in der Literatur zu beobachtenden Schwierigkeiten bei der graphischen oder mathematischen Behandlung sowie der Interpretation von Bindungsexperimenten am System: Insulin/Insulinreceptor mit der Wahl der höchsten in Bindungsexperimenten verwendeten totalen Ligandenkonzentration sowie der allgemeinen Unsicherheit zu Qualität, Quantität und Verwendung der unspezifischen Bindung in engem Zusammenhange steht.

Wird eines der beiden bevorzugten Modelle zur Ermittlung der Bindungskenngrößen zugrundegelegt, so wird üblicherweise derart verfahren, daß die unspezifische Bindung bei 1,7–17  $\mu\text{mol/l}$  totaler Insulinkonzentration ermittelt und von den bei niedrigerer Konzentration unmarkierten Insulins ermittelten Bindungswerten subtrahiert wird. Die auf diese Weise korrigierten Werte werden dann in die *Scatchard*-Beziehung transformiert, aus der graphisch durch Extrapolation oder rechnerisch durch lineare Regression des initialen und/oder terminalen Teils des *Scatchard*plots als Schnittpunkt(e) mit der x-Achse die maximal gebundene(n) Insulin-Konzentration(en) entsprechend der (den) Receptorkonzentration(en) ermittelt wird (werden).

Sowohl die Wahl der Konzentration des unmarkierten Hormons zur Ermittlung der unspezifischen Bindung als auch die Wahl des untersuchten totalen Konzentrationsbereichs, aus dem die Daten zur Berechnung der Bindungskenngrößen extrahiert werden, sind individuell willkürlich. Ebenso individuell unterschiedlich werden die errechneten Bindungskenngrößen gefunden. So werden für die Anzahl an Insulinreceptoren auf dem Erythrocyten Werte zwischen 10 und 2000 beschrieben (7).

Bei der Ermittlung der Bindungskenngrößen aus transformierten oder nicht transformierten Daten mit Hilfe nichtlinearer Regressionsverfahren wird zwar die unspezifische Bindung als unbekannte Kenngröße in das Iterationsverfahren übernommen; da jedoch dem Untersucher die Festlegung des insgesamt zu untersuchenden Konzentrationsbereichs überlassen bleibt, stellt dieses, wie sich zeigen

läßt, ebenfalls eine erhebliche Willkür dar. Denn die durch das Iterationsverfahren für ein- oder zweiklassige Receptormodelle ermittelten Kenngrößen werden allein schon durch die mit der unterschiedlichen Wahl des Konzentrationsbereichs verbundene Wichtung manipuliert.

Es ist unser Ziel, systeminterne Kriterien abzuleiten, die die Festlegung der zur Ermittlung der unspezifischen Bindung verwendeten totalen Hormonkonzentration und/oder des insgesamt zu untersuchenden Konzentrationsbereichs des Hormons erleichtern und damit eine Vergleichbarkeit derartiger Bindungsexperimente gewährleisten.

Wir haben zur Untersuchung dieser Fragestellung Bindungsexperimente mit Erythrocyten und [ $^{125}$ I]Insulin/Insulin durchgeführt, wobei das Verhalten des Systems bis hin zu hohen Konzentrationen des Hormons untersucht wird. Die Auswertung erfolgt nach dem für das negative Kooperativitätsmodell beschriebenen Verfahren, nach dem von uns beschriebenen Verfahren durch lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots (8, 9) sowie mit einem nichtlinearen Regressionsverfahren, das für das einklassige Receptormodell 3 Kenngrößen ( $K_a$ ,  $R_0$ ,  $U$ ) und für das zweiklassige Bindungsmodell 5 Kenngrößen ( $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$ ,  $R_{01}$ ,  $R_{02}$ ,  $U$ ) durch Iteration der Meßwerte über den jeweiligen vorgegebenen Hormon-Konzentrationsbereich ermittelt. Darüber hinaus soll anhand der für ein Blutspender-Kollektiv ermittelten Daten versucht werden, durch Modellbetrachtungen zur Größenordnung der Affinitätskonstanten und der Receptorkonzentration einen biologischen Zusammenhang mit den physiologisch vorliegenden Insulinkonzentrationen herzustellen.

## Material und Methoden

### Reagenzien, Lösungen

Hoechst AG: [ $^{125}$ I]Insulin (vom Schwein), spezifische Aktivität 6,41 GBq/mg (175 mCi/mg), lyophil.; das verwendete [ $^{125}$ I]Insulin wird chromatographisch gereinigt (7);

Novo: Schweineinsulin, 10  $\times$  kristallisiert, 1 mg = 25 IU;

Serva: Rinderserumalbumin, lyophil., rein, 92% (Cohn-Fraktion V); EDTA $\cdot$ Na $_2$  $\cdot$ H $_2$ O;

E. Merck: NaCl; KCl; CaCl $_2$  $\cdot$ 2H $_2$ O; MgCl $_2$  $\cdot$ 6H $_2$ O; D-(+)-Glucose; Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS); Barbitol-Natrium; Natriumacetat, wasserfrei; Natriumazid; Trichloressigsäure; Dibutylphthalat, Dichte 1,05 kg/dm $^3$ ;

Sigma: HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure);

Pharmacia: Ficoll-Paque (100 ml enthält: 5,7 g Ficoll 400, 9 g Natrium-Diatrizoat) Dichte 1,077  $\pm$  0,001 kg/dm $^3$ ; Sephadex G-10;

Pufferlösung 1: NaCl 50 mmol/l; KCl 5 mmol/l; CaCl $_2$  10 mmol/l; MgCl $_2$  10 mmol/l; TRIS 50 mmol/l; EDTA  $\cdot$  Na $_2$  2 mmol/l; HEPES 50 mmol/l; D-Glucose 10 mmol/l; Rinderserumalbumin 1 g/l; pH 7,4 bei 15  $^{\circ}$ C;

Pufferlösung 2: Barbitol-Natrium 7,13 mmol/l; Natriumacetat 11,8 mmol/l; Natriumchlorid 138 mmol/l; Natriumazid 15,4 mmol/l; Rinderserumalbumin 1 g/l; pH 7,4;

Trichloressigsäure in Wasser 100 g/l.

### Insulin-Standardlösungen

5 mg Insulin werden in 0,03 mol/l HCl gelöst und mit Pufferlösung 1 auf 22 Konzentrationen zwischen 0,2 und 870 000 nmol/l verdünnt (Bindungsexperimente I) bzw. auf 0,87–174 000 nmol/l (Bindungsexperimente II) (7).

### Erythrocytenisolierung

Die Erythrocyten werden aus Blut männlicher Spender durch Modifikation der Verfahren von Böyum (10) und Gambhir (11) isoliert.

### Bindungsexperimente

I) 800  $\mu$ l Erythrocytensuspension ( $6,38 \cdot 10^{12}$ /l) werden mit 800  $\mu$ l Insulin-Standardlösungen (0,2–870 000 nmol/l) und 100  $\mu$ l [ $^{125}$ I]Insulinlösung (3,98 nmol/l entsprechend 530 000 Imp/min  $\cdot$  100  $\mu$ l) in einem Schüttelwasserbad 3 Stunden bei 15  $^{\circ}$ C inkubiert (die Konzentrationen der Reaktionspartner im Testansatz betragen: Erythrocyten  $3 \cdot 10^{12}$ /l; Insulin-Standards 0,094–409 410 nmol/l; [ $^{125}$ I]Insulin 0,234 nmol/l). Nach der Inkubation werden aus jedem der 22 Inkubationsansätze 5 mal 200  $\mu$ l-Aliquots entnommen, in 250  $\mu$ l Pufferlösung 1 und 250  $\mu$ l Dibutylphthalat enthaltende und auf 0  $^{\circ}$ C vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße dosiert, 1,5 min bei 12 000 g zentrifugiert, die totale Radioaktivität für 1 min gemessen, die Überstände inklusive etwa 100  $\mu$ l Dibutylphthalat abgesaugt, die Spitze des Reaktionsgefäßes mit dem Zellsediment und etwa 50  $\mu$ l restlichem Dibutylphthalat mit Hilfe eines heißen Skalpells abgeschnitten und hierin die Radioaktivität für 10 min mit einem Multi-Crystal Gamma Counter LB 2100, Fa. Berthold, gemessen.

Der Anteil an gebundenem Insulin wird berechnet als Quotient der im Erythrocytensediment gemessenen Radioaktivität und der totalen Radioaktivität des zugehörigen 200  $\mu$ l-Aliquots des Inkubationsansatzes. Die Daten werden auf  $4 \cdot 10^{12}$  Zellen/l normiert.

II) Die Bindungsexperimente mit Erythrocyten von 11 Blutspendern werden wie zuvor beschrieben (7) durchgeführt und ausgewertet.

### Ermittlung der Kenngrößen

Lineare Regression des terminalen Teils des *Scatchard* plots

Hierbei handelt es sich um das konventionelle Verfahren zur Ermittlung der maximal gebundenen Insulinkonzentration mit Hilfe des *Scatchard* plots, über den das negative Kooperativitätsmodell angewandt wird. Nach Transformation der relativ gebundenen Insulinkonzentration (subtraktiv korrigiert mit der bei der höchsten totalen Insulinkonzentration ermittelten relativen Bindung) in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration in die [HR]/[H]-[HR]-Beziehung wird nach successivem Weglassen des jeweils letzten Wertepaares mit Hilfe der jeweils letzten fünf Wertepaare durch lineare Regression der jeweilige Schnittpunkt des auf diese Weise extrapolierten *Scatchard* plots mit der x-Achse ermittelt und hieraus die Receptorzahl pro Erythrocyt  $R_0$  errechnet.

Lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots

Durch lineare Regression der ersten fünf Wertepaare im *Scatchard* plot werden aus der Steigung die jeweiligen Affinitätskonstanten und aus dem Schnittpunkt mit der x-Achse die jeweiligen maximal gebundenen Insulinkonzentrationen ermittelt. Bevor die Transformation der Daten in die *Scatchard*-Beziehung erfolgt, wird hierbei mit der höchsten totalen Insulinkonzentration beginnend der jeweils letzte relative Bindungswert als unspezifische Bindung zur subtraktiven Korrektur der initialen fünf Bindungswerte verwendet.

## Nichtlineares Regressionsverfahren

Zur Kenngrößenextraktion wird ein nichtlineares, auf dem Algorithmus von *Marquardt* (12) basierendes Regressionsverfahren angewandt, das die Meßdaten über die Fehlerquadrat-Minimierung durch Iteration sowohl einem einklassigen Bindungsmodell ( $K_1, R_0, U$ ) als auch einem zweiklassigen Bindungsmodell ( $K_{a1}, K_{a2}, R_{01}, R_{02}, U$ ) anzupassen versucht. Hierbei wird mit allen 22 Wertepaaren ( $B/T, T$ ) beginnend und dann jeweils das letzte Wertepaar weglassend der Einfluß der schrittweisen Verkleinerung des Bereichs der totalen Insulinkonzentration auf die Bindungskenngrößen mit Hilfe eines HP 9835 A-Rechners untersucht.

## Direkte Anpassung an die Kompetitions-Inhibitions-Kurve

$B/T$  gegen  $T$  durch das einklassige und zweiklassige Bindungsmodell

$(B/T)_1 \triangleq$  Funktion der einklassigen Anpassung

$(B/T)_2 \triangleq$  Funktion der zweiklassigen Anpassung

$T \triangleq$  Gesamtkonzentration des Liganden

$B \triangleq$  Konzentration des gebundenen Liganden

$F \triangleq$  Konzentration des ungebundenen Liganden

$B/T \triangleq$  relativer Bindungsanteil ( $\text{Imp./min}_{\text{gebunden}}/\text{Imp./min}_{\text{total}}$ )

$U/T \triangleq$  relativer unspezifischer Bindungsanteil

$B/F \triangleq$  Verhältnis der Konzentrationen des gebundenen und des ungebundenen Anteils

$FG \triangleq$  Freiheitsgrade (Anzahl der Meßwerte - Anzahl der Parameter)

$SSR \triangleq$  Summe der Residuenquadrate

$S_R^2 \triangleq$  Restvarianzen

$S_R \triangleq$  Standardrestfehler

$K_1, R_1, U_1 \triangleq$  Affinität, Receptorkonzentration, unspezifische Bindung ( $\triangleq$  zu iterierende Parameter im einklassigen Bindungsmodell)

$K_1, R_1, K_2, R_2, U_2 \triangleq$  entsprechende Kenngrößen im zweiklassigen Bindungsmodell

$K'_2, R'_2 \triangleq$  Konstanten des unspezifischen Anteils  $U_1$

$K'_3, R'_3 \triangleq$  Konstanten des unspezifischen Anteils  $U_2$

$$B/T = \frac{B/F}{1 + B/F} \quad \text{Gl. 6}$$

$$B = \sum_{i=1}^n \frac{R_i K_i F}{1 + K_i F}, \quad n = 2, 3 \quad (19, 20) \quad \text{Gl. 7}$$

$$B/F = \sum_{i=1}^n \frac{R_i K_i}{1 + K_i F}, \quad n = 2, 3 \quad \text{Gl. 8}$$

$$F = T(1 - B/T) \quad \text{Gl. 9}$$

Für den unspezifischen Bindungsanteil gelten die Beziehungen:

einklassig:  $i = n = 2$  (3 Parameter)

$$\frac{R'_2 K'_2}{1 + K'_2 F} = U_1, \quad \text{Gl. 10}$$

wegen  $K'_2 \ll R'_2$  folgt  $U_1 = K'_2 R'_2 = \text{konstant}$  (13)

zweiklassig:  $i = n = 3$  (5 Parameter)

$$\frac{R'_3 K'_3}{1 + K'_3 F} = U_2, \quad \text{Gl. 11}$$

wegen  $K'_3 \ll R'_3$  folgt  $U_2 = K'_3 R'_3 = \text{konstant}$  (13)

wobei  $U/T = \frac{U}{1 + U}$  den zugehörigen Wert in der Kompetitions-

Inhibitions-Kurve repräsentiert.

Damit folgt für das einklassige Bindungsmodell aus Gleichungen 6, 8, 9, 10:

$$(B/T)_1 = f_1(K_1, R_1, U_1, T, B/T)$$

$$(B/T)_1 = \frac{U_1(K_1 T(1 - B/T) + 1) + K_1 R_1}{U_1(K_1 T(1 - B/T) + 1) + K_1 T(1 - B/T) + K_1 R_1}$$

und für das zweiklassige Modell aus Gleichungen 6, 8, 9, 11:

$$(B/T)_2 = f_2(K_1, R_1, K_2, R_2, U_2, T, B/T)$$

$$(B/T)_2 = \frac{U_2(K_1 T(1 - B/T) + 1)(K_2 T(1 - B/T) + 1) + U_2(K_1 T(1 - B/T) + 1)(K_2 T(1 - B/T) + 1) + \frac{K_1 R_1(K_2 T(1 - B/T) + 1) + (K_1 T(1 - B/T) + 1)(K_2 T(1 - B/T) + 1) + K_2 R_2(K_1 T(1 - B/T) + 1)}{K_1 R_1(K_2 T(1 - B/T) + 1) + K_2 R_2(K_1 T(1 - B/T) + 1)}}$$

Für den Iterationsprozeß sind weiterhin die partiellen Ableitungen nach den entsprechenden Kenngrößen erforderlich, um nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die Abweichungen der Kurvenpunkte von den Meßpunkten zu minimieren. Wegen der unterschiedlichen Anzahlen von Meßpunkten und Kenngrößen ergeben sich jeweils nicht vergleichbare Fehlerquadratsummen  $SSR$  für die linearen und die nichtlinearen Methoden. Ein Vergleich ist erst dann möglich, wenn die verschiedenen  $SSR$  mit Hilfe der zugehörigen Freiheitsgrade normiert werden. Daher werden die Restvarianzen  $S_R^2$  bzw. deren Quadratwurzel, die Standardrestfehler, verwendet.

Zur Ermittlung der Bindungskenngrößen für ein Blutspender-Kollektiv ( $n = 11$ ) wird eine bereits früher beschriebene Methode verwendet, die dem zuvor beschriebenen Verfahren zur Ermittlung der Kenngrößen durch lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots entspricht (7-9).

## Ergebnisse

Lineare Regression des terminalen Teils des *Scatchard* plots

Bei der Berechnung der Bindungskenngrößen anhand des negativen Kooperativitätsmodells muß als

erstes die totale Receptorkonzentration ermittelt werden. Dieses geschieht dadurch, daß nach Subtraktion der unspezifischen Bindung (hier nach Subtraktion des bei der höchsten totalen Insulinkonzentration von 409  $\mu\text{mol/l}$  Testansatz gemessenen prozentualen Bindungswertes; Abb. 1) und Transformation in die *Scatchard*-Beziehung aus den Wertepaaren des terminalen Teils des *Scatchard* plots durch Extrapolation (lineare Regression) die maximal gebundene Insulinkonzentration als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse und hieraus nach Gleichung 5 die Zahl der Rezeptoren pro Erythrocyt  $R_0$  berechnet werden.

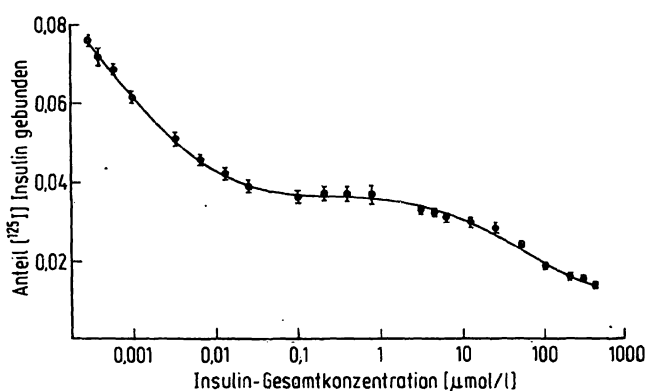


Abb. 1. Kompetitions-Inhibitions-Kurve der  $[^{125}\text{I}]$ Insulin/Insulin-Bindung an Erythrocyten ( $4 \cdot 10^{12} \text{ l}^{-1}$ ).  $^{125}\text{I}$ -Insulinbindung:  $\bar{x}$  bei  $n = 5$ .

Verwendet man bei successiver Verkürzung unter Weglassung des jeweils letzten Wertepaares die jeweils fünf letzten Wertepaare des *Scatchard* plots, um  $R_0$  zu ermitteln, so läßt sich eine typische Abhängigkeit der Receptorkonzentration  $R_0$  von der totalen Insulinkonzentration beobachten (Abb. 2). Bei hohen totalen Insulinkonzentrationen ( $8 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^5 \text{ nmol/l}$ ) werden auf diese Weise maximal gebundene Insulinkonzentrationen zwischen 340 und 1420  $\text{nmol/l}$  entsprechend 51 000–213 000 Rezeptoren/Erythrocyt bei außerordentlich großer Streuung der Werte berechnet. Zwischen 6 und 400  $\text{nmol/l}$  totaler Insulinkonzentration wird die relativ größte Änderung von  $R_0$  beobachtet, während bei noch geringeren totalen Insulinkonzentrationen eine Annäherung von  $R_0$  an 0,05–0,1  $\text{nmol/l}$  entsprechend 7,5–15 Rezeptoren/Erythrocyt erfolgt.

Die über die Beziehung

$$\bar{K}'_e = \frac{([\text{HR}]/[\text{H}])_{\text{max}}}{R_0 - [\text{HR}]_{\text{max}}}$$

für die unterschiedlichen  $R_0$ -Werte berechnete jeweilige mittlere Affinitätskonstante  $\bar{K}'_e$  des 'unbesetzten' Receptors zeigt aufgrund der umgekehrten Proportionalität von  $\bar{K}'_e$  und  $R_0$  spiegelbildliches Verhalten, d.h. einen Anstieg der Affinität mit abnehmender totaler Insulinkonzentration und eine Annäherung an  $\bar{K}'_e$ -Werte von  $10^8 - 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

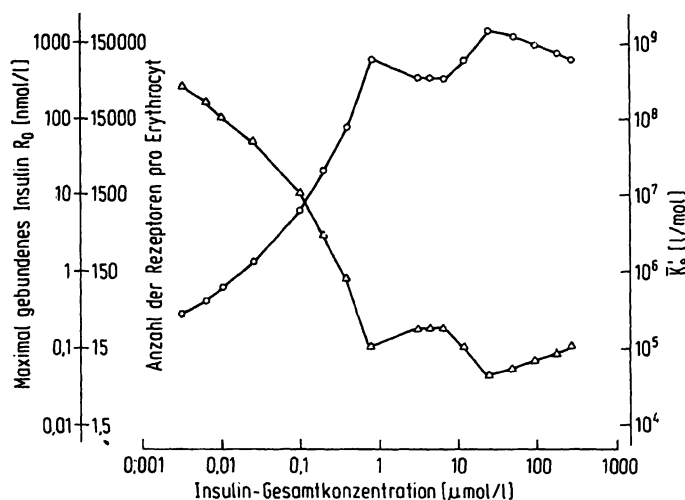


Abb. 2. Lineare Regression des terminalen Teils des *Scatchard* plots zur Anwendung im negativen Kooperativitätsmodell.

Maximal gebundene Insulinkonzentration/Receptorkonzentration  $R_0$  (O; linke Ordinate), ermittelt durch lineare Regression der jeweils fünf letzten Wertepaare des *Scatchard* plots (zu den Daten der Abb. 1) und 'high affinity'-Konstante  $\bar{K}'_e = (B/F)_{\text{max}}/R_x - B_{\text{max}}$  (Δ; rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration bei successivem Wegfall des jeweils letzten Wertepaares.

### Lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots

Konzentriert man sich auf den initialen Teil des *Scatchard* plots – im negativen Kooperativitätsmodell entspräche dieses dem 'unbesetzten' Receptor, im Zweiklassen-Modell dem hochaffinen Receptor – so lassen sich durch lineare Regression der ersten fünf Wertepaare nach jeweiliger vorheriger Korrektur für die unspezifische Bindung aus Steigung und Abszissenschnittpunkt  $K_a$  und  $R_0$  berechnen. In den Ansätzen der linearen wie auch der nichtlinearen Modelle ist mit der unspezifischen Bindung als eigenem Term jene Korrektur impliziert, die zur korrekten Interpretation der *Scatchard*-Beziehung notwendig ist (18). Werden zu dieser Korrektur die höheren als dem fünften Wertepaar entsprechenden totalen Insulinkonzentrationen verwendet, so kann man den in Abbildung 3 dargestellten Zusammenhang zwischen  $R_0$  bzw.  $K_a$  und den zur Ermittlung der unспе-

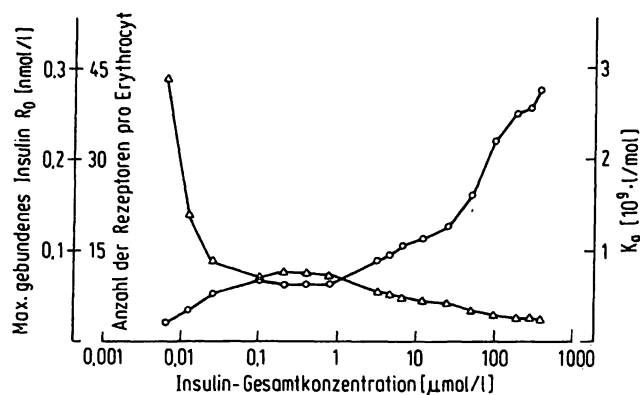


Abb. 3. Lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots. Maximal gebundene Insulinkonzentration/Rezeptorkonzentration  $R_0$  (○; linke Ordinate) und Affinitätskonstante  $K_a$  (△; rechte Ordinate), ermittelt durch lineare Regression der ersten fünf Wertepaare des *Scatchard* plots (zu den Daten der Abb. 1) in Abhängigkeit von der zur Ermittlung der unspezifischen Bindung verwendeten totalen Insulinkonzentration.

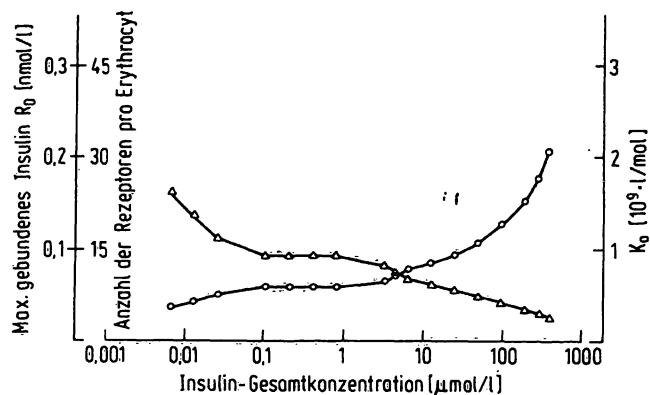


Abb. 4. Nichtlineare Regression – einklassiges Bindungsmodell. Maximal gebundene Insulinkonzentration/Rezeptorkonzentration  $R_0$  (○; linke Ordinate) und Affinitätskonstante  $K_a$  (△; rechte Ordinate), ermittelt durch nichtlineare Regression in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration (successive Verkleinerung des totalen Insulinkonzentrations-Bereichs).

zifischen Bindung verwendeten totalen Insulinkonzentrationen beobachten. Hierbei steigt  $R_0$  zunächst mit zunehmender totaler Insulinkonzentration an, erreicht zwischen 100 und 1000 nmol/l ein Plateau (mit  $R_0$ -Werten von 0,06 nmol/l bzw. 9 Rezeptoren/Zelle) und steigt dann bis zur höchsten untersuchten Insulinkonzentration kontinuierlich weiter an. Die Affinitätskonstante verhält sich gegenläufig, indem sie bei niedrigen Insulinkonzentrationen von höheren Werten kommend ebenfalls zwischen 100 und 1000 nmol/l ein Plateau erreicht (entsprechend einer Affinitätskonstanten von  $0,7 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), um dann bei weiter steigenden totalen Insulinkonzentrationen stetig abzufallen.

### Nichtlineare Regression

Zur Ermittlung der Kenngrößen mit Hilfe des zuvor beschriebenen nichtlinearen Regressionsverfahrens werden für das einklassige Rezeptormodell  $K_a$ ,  $R_0$  und  $U$  durch Computeranalyse iteriert, für das zweiklassige Rezeptormodell  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$ ,  $R_{01}$ ,  $R_{02}$ ,  $U$ .

### Einklassiges Modell

Ausgehend von einer Anpassung aller 22 Wertepaare und folgender schrittweiser Verkleinerung des totalen Konzentrationsbereichs (Abb. 4) sinkt  $R_0$  stetig, um bei etwa 1000 nmol/l ein Plateau zu erreichen (entsprechend 0,06 nmol/l bzw. 9 Rezeptoren/Zelle), das bei etwa 100 nmol/l hin zu kleineren totalen Insulinkonzentrationen in einen weiteren Abfall von  $R_0$  übergeht. Die Affinitätskonstante ver-

läuft gegensinnig zu  $R_0$ , sie steigt, von hohen totalen Insulinkonzentrationen ausgehend, zunächst an, erreicht zwischen 100 und 1000 nmol/l ein Plateau (entsprechend  $0,9 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) und steigt dann mit abnehmender totaler Insulinkonzentration weiter an.

### Zweiklassiges Modell

Für das zweiklassige Rezeptormodell werden die Kenngrößen des hochaffinen und des niedrigaffinen Rezeptors separat dargestellt. Für den hochaffinen Rezeptor (Abb. 5a) liegt  $R_{01}$  unabhängig von der totalen Insulinkonzentration bei geringen Schwankungen um 0,05 nmol/l bzw. 7,5 Rezeptoren/Zelle, während die Affinitätskonstante  $K_{a1}$  bis herab zu einer totalen Insulinkonzentration von etwa 200 nmol/l um  $10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$  liegt und hin zu kleineren totalen Insulinkonzentrationen geringfügig bei größeren Schwankungen anzusteigen scheint. Die Kenngrößen des niedrigaffinen Rezeptors (Abb. 5b) zeigen große Schwankungen, wobei die  $R_0$ -Werte von hohen totalen Insulinkonzentrationen ausgehend insgesamt leicht abfallende Tendenz zeigen und zwischen 4 und 260 nmol/l bzw. 600–39000 Rezeptoren/Zelle streuen, während die  $K_{a2}$ -Werte in der gleichen Richtung insgesamt leicht steigende Tendenz zeigen und zwischen 0,00008 und  $0,0046 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$  streuen.

Zum Vergleich der Anpassungsgüte werden die Standardrestfehler  $S_R$  in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration dargestellt (Abbildung 6). Während für die nichtlineare einklassige Anpassung die geringsten Standardrestfehler bis zu etwa 1000 nmol/l totaler Insulinkonzentration mit anschließen-

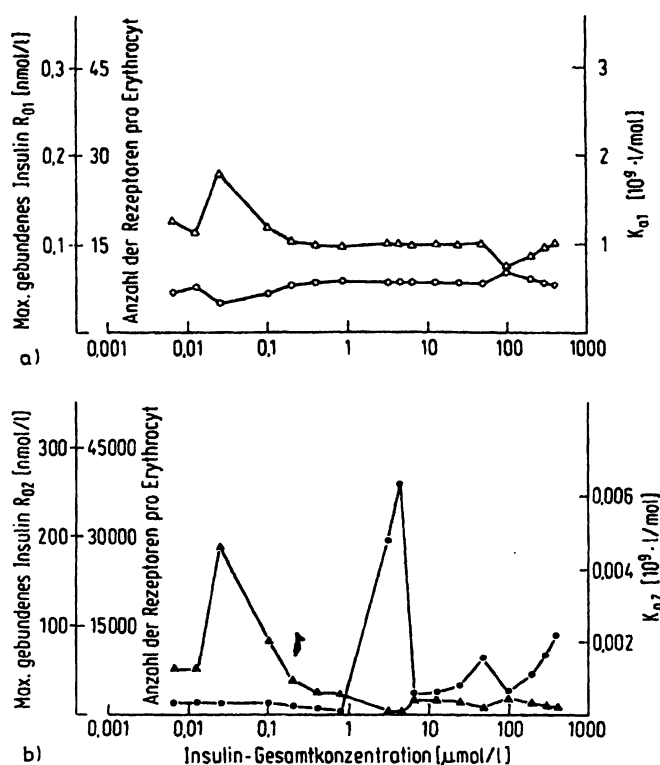


Abb. 5. Nichtlineare Regression – zweiklassiges Bindungsmodell.

Maximal gebundene Insulinkonzentration/Rezeptorkonzentration  $R_0$  (linke Ordinate) und Affinitätskonstante  $K_a$  (rechte Ordinate), ermittelt durch nichtlineare Regression in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration (successive Verkleinerung des totalen Insulinkonzentrations-Bereichs).

- a) hochaffiner Rezeptor ( $R_{01}$  ○;  $K_{a1}$  Δ)  
b) niedrigaffiner Rezeptor ( $R_{02}$  ●;  $K_{a2}$  ▲)

dem Anstieg bei zunehmender totaler Insulinkonzentration beobachtet werden, ist der Bereich minimaler Fehler bei der zweiklassigen nichtlinearen Anpassung bis etwa 30 000 nmol/l ausgedehnt. Demgegenüber fällt der Standardrestfehler der initialen linearen Anpassung mit zunehmender totaler Insulinkonzentration bis etwa 100 nmol/l ab, bleibt bis 1000 nmol/l konstant und fällt dann stetig weiter ab; er liegt insgesamt höher als bei den nichtlinearen Anpassungsverfahren wegen der durch die Transformation bedingten Fehlerfortpflanzung. Der Standardrestfehler für die terminale lineare Anpassung, der infolge der konsekutiven Berechnungsart der Kenngrößen im negativen Kooperativitätsmodell nur aus der  $R_0$ -Ermittlung resultiert, ist zwischen  $10^3$  und  $10^5$  nmol/l totaler Insulinkonzentration minimal, außerhalb dieses Bereiches übersteigt er die Fehler der weiteren Verfahren. Nach Transformation der Meßwerte in die *Scatchard*-Beziehung und Ermittlung des jeweiligen  $R_0$  erfolgt eine weitere Transformation der Daten in die Beziehung des mittleren Affinitätsprofils zur Ermittlung von  $\bar{K}_e$  und

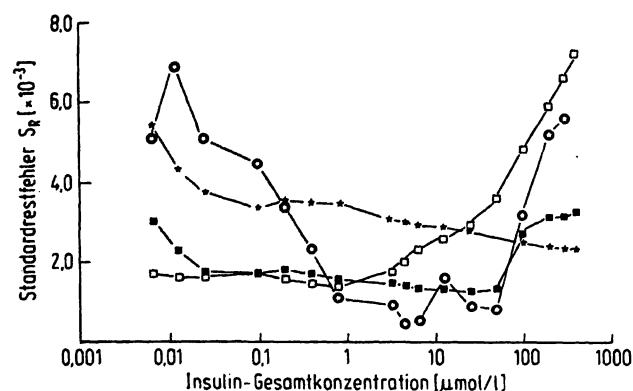


Abb. 6. Vergleich der Anpassungsgüte bei linearer, nichtlinearer einklassiger und nichtlinearer zweiklassiger Regression. Standardrestfehler  $S_r = \sqrt{SSR/FG}$  in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration.

- ★ initiale lineare Regression  
● terminale lineare Regression  
□ nichtlineare Regression einklassig  
■ nichtlineare Regression zweiklassig

$\bar{K}_f$ . Die damit verbundene Zunahme an Ungenauigkeit aufgrund der Fehlerfortpflanzung belastet die Affinitätskonstanten zusätzlich.

### Kenngrößen für das Blutspenderkollektiv

Aus den Bindungsexperimenten an Erythrocyten männlicher Blutspender ( $n = 11$ ) werden aus der mittleren Kompetitions-Inhibitions-Kurve die in Tabelle 1 angeführten relativen spezifischen Bindungswerte für die totalen Insulinkonzentrationen zwischen 0,1 und 10 000 nmol/l Testansatz entnommen. Unter Annahme von drei unterschiedlichen Affinitätskonstanten ( $10^7$ ;  $5 \cdot 10^8$ ;  $10^{10} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) werden die jeweils zugehörigen Rezeptor-Besetzungsgrade berechnet.

Tab. 1. [ $^{125}\text{I}$ ]Insulin/Insulin-Bindung an Erythrocyten männlicher Blutspender ( $n = 11$ ). Mittlere spezifische prozentuale Bindung in Abhängigkeit von der totalen Insulinkonzentration (nmol/l) sowie Rezeptorbesetzung (%) für drei unterschiedliche Affinitätskonstanten.

Insulin-Konzentration im Plasma (mU/l)	Totale Insulinkonzentration (nmol/l)	Spezifische Insulinbindung (%)	Rezeptor-Besetzung (%)		
			$K_a = 10^7 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$	$5 \cdot 10^8 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$	$10^{10} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$
15	0,1	7,60	0,09	4,4	48,0
150	1	4,65	0,94	32,0	90,5
	5	2,40	4,65	71,0	98,0
	10	1,77	8,94	83,0	99,0
	100	0,97	49,7	98,0	99,9
	1000	0,48	90,9	99,8	99,99
	10000	0,32	99,0	99,9	99,999



## Diskussion

Differierende Resultate und die Unsicherheit in der Anwendung des ‚wahren‘ mathematischen Verfahrens zur Kenngrößenextraktion aus Gleichgewichts-Bindungsexperimenten in Insulin/Insulinreceptor-Systemen liegen zum einen in bisher offenkundig vernachlässigten experimentellen Unterschieden, zum anderen in der Anwendung alternativer mathematischer Möglichkeiten begründet, von denen keiner anhand objektiver Kriterien eine vorrangige Stellung zuzukommen scheint. Bei Durchsicht der Literatur zur Wechselwirkung von Insulin mit dem Erythrocyten-Insulinreceptor fällt auf, daß ein Zusammenhang zwischen den von den einzelnen Untersuchern zufällig gewählten höchsten totalen Ligandenkonzentrationen, mit deren Hilfe durch Extrapolation im *Scatchard* plot der Abszissenschnittpunkt berechnet wird, und der errechneten Rezeptorzahl pro Zelle zu bestehen scheint; es sind zwischen 10 und 2000 Rezeptoren/normaler Erythrocyt beschrieben worden (7, 14, 15).

Um die wechselseitigen Beziehungen zwischen unspezifischer Bindung, insgesamt untersuchtem totalen Insulinkonzentrations-Bereich, Art der mathematischen Datenbehandlung und physiologischer und pathophysiologischer Relevanz der totalen Insulinkonzentrations-Höhe in Bindungsexperimenten zu verstehen, haben wir uns auf das System ‚erythrocytärer Insulinreceptor/Insulin‘ konzentriert und sein Verhalten unter Bedingungen untersucht, die es gestatten, einzelne der wechselseitigen Einflüsse voneinander differenzieren zu können. Der oben beschriebene in der Literatur beobachtete Zusammenhang wird in einem alle Konzentrationsbereiche des Liganden umfassenden Experiment dargestellt und von ihm widerspiegelt, in dem das Verhalten des Systems bis hin zu hohen totalen Insulinkonzentrationen untersucht wird (Abb. 1). Durch die hierbei angewandte Art der Berechnung der Bindungskenngrößen (*Scatchard* plot, negatives Kooperativitätsmodell) ist es jedoch nicht möglich, die Einflüsse von unspezifischer Bindung und gesamtem Konzentrationsbereich der totalen Insulinkonzentrationen auf Affinität und Konzentration des Receptors zu unterscheiden. Es gibt zunächst keinen Hinweis dafür, daß ein Konzentrationsbereich im hyperbolischen Verlauf des *Scatchard* plots zur Ermittlung von  $R_0$  bevorzugt ist, aus Abbildung 2 ist lediglich zu entnehmen, daß die Änderung sowohl von  $R_0$  als auch von  $K_a$  zwischen 100 und 1000 nmol/l totaler Insulinkonzentration am größten ist. Auch bei extrem hohen totalen Insulinkonzentrationen scheint es zu einer stetigen weiteren Abnahme des relativ gebundenen Insulinanteils zu kommen (Abb. 1) ent-

sprechend einer stetigen Zunahme der absoluten gebundenen Insulinmenge. Möglicherweise spielen hier die Internalisierung (16) und/oder nicht sättigbare unspezifische Effekte eine überwiegende Rolle. Aufgrund der methodisch bedingten großen Streuungen in diesem Bereich sind hier, Aussagen über Bindungskenngrößen wenig zuverlässig. Unterhalb von 100 nmol/l totaler Insulinkonzentration jedoch werden die Veränderungen mit der totalen Insulinkonzentration geringer, womit offenkundig eine ‚Stabilisierung‘ der Ermittlung der Bindungskenngröße durch lineare Regression erreicht wird. Diese Beobachtung leitet zur zweiten Art der Ermittlung der Bindungskenngröße durch alleinige lineare Regression des initialen Teils des *Scatchard* plots über (7–9). Da hierbei der Konzentrationsbereich fixiert wird, kann durch Variation der unspezifischen Bindung ihr Einfluß auf  $R_0$  und  $K_a$  erkannt werden (Abb. 3). Für unspezifische Bindungen von 100–1000 nmol/l ist in diesem System Konstanz der Bindungskenngrößen zu beobachten und damit eine gewisse systemische Sicherheit gewährleistet, bei der physiologisch-pathophysiologische Unterschiede im untersuchten System nicht von methodischen verdeckt werden können. Bei der Ermittlung der Bindungskenngrößen durch ein nichtlineares Regressionsverfahren werden für das einklassige Receptormodell nahezu identische Zusammenhänge zwischen  $R_{01}$  bzw.  $K_{a1}$  und totaler Insulinkonzentration, d. h. dem untersuchten Gesamtbereich, beobachtet, auch die Größenordnungen für  $R_0$  und  $K_a$  entsprechen nahezu denen des linearen Regressionsverfahrens im initialen Teil des *Scatchard* plots, wenn man auch hier wiederum den ‚stabilen‘ Konzentrationsbereich zwischen 100 und 1000 nmol/l vergleicht (Abb. 4). Selbst im zweiklassigen Receptormodell ergibt sich bei nichtlinearer Regression für den hochaffinen Receptor wiederum die gleiche Größenordnung für  $R_0$  und  $K_a$ , nur daß hier die Konstanz der Kenngrößen bis zu höheren totalen Insulinkonzentrationen erweitert ist (Abb. 5a). Die Befunde machen deutlich, daß dem initialen Teil der Kompetitions-Inhibitions-Kurve bis etwa zur halbmaximalen Verdrängungskonzentration und daher auch dem initialen Teil des *Scatchard* plots eine ungleich wesentlichere und experimentell zuverlässigere Bedeutung zukommt. Diesem Teil kommt auch im Regelgeschehen sicherlich die größte Bedeutung zu. Ob ein System ein- oder zweiklassig ist, ob es negativ kooperativ reagiert oder nicht, ist regulativ weniger entscheidend als die Tatsache, daß ein biologischer Effekt insulinsensitiver Zellen bei etwa 10%iger Receptorbesetzung maximal ausgeprägt ist (17) und daß dieser Besetzungsgrad das System biologisch maximal/optimal arbeiten läßt. Vergleicht man die physiologi-



schen Insulinkonzentrationen im Plasma unter den extremen Regelbedingungen (Basalkonzentration: etwa  $15 \text{ mU/l} \triangleq 0,1 \text{ nmol/l}$ ; Maximalkonzentration nach Kohlenhydrat-Belastung: etwa  $150 \text{ mU/l} \triangleq 1 \text{ nmol/l}$ ) mit den bei Bindungsexperimenten eingesetzten Konzentrationen, so fällt auf, daß selbst die höchsten physiologisch vorkommenden Insulinkonzentrationen den bei Bindungsexperimenten verwendeten Konzentrationen im allerersten Teil der Kompetitions-Inhibitions-Kurve, d.h. unterhalb der halbmaximalen Verdrängungskonzentration, entsprechen. Damit das System zwischen  $0,1$  und  $1 \text{ nmol/l}$  Insulinkonzentration effektiv geregelt werden kann, sollte innerhalb dieses Konzentrationsbereichs auch eine entsprechende Besetzung des Receptors erfolgen. Berechnet man die Besetzung unter Annahme mehrerer Affinitätskonstanten (Tab. 1), so scheint eine Affinitätskonstante von etwa  $0,5 \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$  den Verhältnissen einer sinnvollen Regulationsmöglichkeit am ehesten zu entsprechen. Eine Affinitätskonstante dieser Größenordnung im System Erythrocyt/Insulin korreliert mit einer Rezeptorzahl von etwa 10/Erythrocyt und verweist somit auch biologisch argumentiert auf die überragend, wenn nicht allein wichtige Bedeutung des initialen Teils von Kompetitions-Inhibitions-Kurve und *Scatchard* plot für ein einklassiges Receptormodell.

Der Einfluß der unspezifischen Bindung macht sich offenbar in Systemen 'Insulinreceptor/Insulin' schon bei relativ geringen totalen Insulinkonzentrationen

in einem fließenden Übergang von spezifischer zu unspezifischer Bindung bemerkbar. Bei zu hohen totalen Insulinkonzentrationen kommen offensichtlich weitere Einflüsse wie Internalisierung oder auch andere konzentrationsabhängige unspezifische Einflüsse dazu.

Die beschriebenen Befunde und Überlegungen lassen folgende Empfehlungen bei der Untersuchung des Insulinreceptors auf Erythrocyten und der Ermittlung von Bindungskenngrößen, insbesondere für Vergleiche physiologischer mit pathophysiologischen Zuständen des Receptors geben:

1. Annahme eines einklassigen Receptormodells
2. Aufnahme einer Kompetitions-Inhibitions-Kurve bis etwa  $1000 \text{ nmol/l}$  totale Insulinkonzentration bei gleichmäßiger Verteilung von etwa 10 unterschiedlichen totalen Insulinkonzentrationen
3. Alternative Kenngrößenextraktion
  - a. nichtlineare Regressionsverfahren; falls nicht verfügbar:
  - b. lineares Regressionsverfahren aus dem *Scatchard* plot unter Verwendung der bis zur halbmaximalen Verdrängungskonzentration ermittelten Wertepaare, die vor der Transformation mit der im Bereich  $100\text{--}1000 \text{ nmol/l}$  ermittelten mittleren unspezifischen Bindung subtraktiv korrigiert werden

## Literatur

1. Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660–672.
2. Berson, S. A. & Yalow, R. S. (1959) *J. Clin. Invest.* 38, 1996–2017.
3. Kahn, C. R., Freychet, P., Roth, J. & Neville, D. M., Jr. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2249–2257.
4. De Meyts, P., Roth, J., Neville, D. M., Jr., Gavin, J. R., & Lesniak, M. A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 154–161.
5. Levitzki, A. (1981) *Nature* 289, 442–443.
6. Corin, R. E. & Donner, D. B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 104–110.
7. Dwenger, A., Mitzkat, H.-J., Holle, W., Tost, P. & Trautschold, I. (1982) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 273–279.
8. Dwenger, A., Tost, P. & Trautschold, I. (1982) *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 311, 471–472.
9. Dwenger, A., Holle, W., Zick, R. & Trautschold, I. (1982) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 731–734.
10. Böyum, A. (1968) *Scand. J. Clin. Invest.* 21, (Suppl. 97), 77–89.
11. Gambhir, K. K., Archer, J. A. & Bradley, C. J. (1978) *Diabetes* 27, 701–708.
12. Marquardt, D. W. (1963) *J. Soc. Indust. and Appl. Math.* 11, 431–441.
13. Kuss, E. (1982) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 227–234.
14. Gambhir, K. K., Nerurkar, S. G., Cruz, I. A. & Hosten, A. O. (1981) *Biochem. Med.* 25, 62–73.
15. Hertzberg, V., Boughter, J. M., Carlisle, S. & Hill, D. E. (1980) *Nature* 286, 279–280.
16. Behr, W. & Tschesche, H. (1980) In: *Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones* (Brandenburg, D. & Wollmer, A., eds.) Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 495–500.
17. Olefsky, J. M. (1976) *J. Clin. Invest.* 57, 842–851.
18. Nørby, J. G., Ottolenghi, P. & Jensen, J. (1980) *Anal. Biochem.* 102, 318–320.
19. Rosenthal, H. E. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 525–532.
20. Weder, H. G., Schildknecht, J., Lutz, R. A. & Kesselring, P. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 475–481.

Dr. rer. nat. Alex Dwenger  
Abteilung für Klinische Biochemie  
Medizinische Hochschule Hannover  
Konstanty-Gutschow-Straße 8  
D-3000 Hannover 61

